

侯丽萍, 舒琥, 刘珊, 等. 广东四会邓村河水体的内分泌干扰效应研究[J]. 环境科学与技术 2015, 38(5): 183-188. Hou Liping, Shu Hu, Liu Shan, et al. Effects of endocrine disruptive chemicals in Dengcun River, Sihui, Guangdong Province[J]. Environmental Science & Technology 2015, 38(5): 183-188.

广东四会邓村河水体的内分泌干扰效应研究

侯丽萍¹, 舒琥^{1*}, 刘珊², 赵建亮², 方展强³

(1. 广州大学生命科学学院 广东 广州 510006; 2. 中国科学院广州地球化学研究所有机地球化学国家重点实验室, 广东 广州 510640; 3. 华南师范大学生命科学学院 广东省高等学校生态与环境科学重点实验室 广东 广州 510631)

摘 要 采用重组基因酵母法检测了受造纸废水污染的广东四会市邓村河水体的雌激素、抗雌激素和雄激素活性效应。结果表明, 受造纸废水污染的位点(A、B、C 点)的雌激素当量值 *EEQ*(E₂ equivalents)、抗雌激素当量值 *TEQ*(E₂ equivalents)、雄激素当量值 *DEQ*(E₂ equivalents)均比对照点 REF 高。各位点的雌激素当量值 *EEQ* 如下: 对照点 REF 为 3.68 ng/L, A 点为 20.03 ng/L, B 点为 15.332 ng/L, C 点为 13.27 ng/L。抗雌激素当量值 *TEQ* 如下: REF 为 0.8 ng/L, A 点为 138.54 ng/L, B 点为 27.61 ng/L, C 点为 31.77 ng/L。雄激素当量值 *DEQ* 如下: REF 点为 0.21 ng/L, A 点为 6.52 ng/L, B 点为 3.92 ng/L, C 点为 4.21 ng/L。

关键词 内分泌干扰物; 生物测试; 造纸废水

中图分类号 X824 文献标志码 A doi:10.3969/j.issn.1003-6504.2015.05.035 文章编号: 1003-6504(2015)05-0183-06

Effects of Endocrine Disruptive Chemicals in Dengcun River, Sihui, Guangdong Province

HOU Liping¹, SHU Hu^{1*}, LIU Shan², ZHAO Jianliang², FANG Zhanqiang³

(1. School of Life Science, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China; 2. State Key Laboratory of Organic Geochemistry, Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China; 3. Key Laboratory of Ecology and Environmental Science in Guangdong Higher Education, College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: This study tested for estrogenic effect, antiestrogenic effect and androgenic effect of pulp and paper mill effluents in Dengcun River using a recombinant yeast bioassay. Estrogenic activity can be detected for all the pulp and paper mill effluents with range from 3.68 to 18.27 ngE EQ/g(dw) of estradiol equivalent. All of samples of pulp and paper mill effluents in Dengcun showed antiestrogenic activity and androgenic activity. TEQ and DEQ in pulp and paper mill effluents sites were both higher than those in REF site.

Key words: endocrine disruptive chemicals; bioassay; pulp and paper mill effluents

造纸废水中含有大量的内分泌干扰物, 常规的水处理技术未能去除所有的内分泌干扰物^[1]。因此, 随造纸废水排放进入环境的内分泌干扰物问题也逐渐引起了人们的高度重视。国外陆续报道了造纸废水具有内分泌干扰效应, 如在其排放口的下游发现了雄性化的雌性食蚊鱼, 这些鱼的卵巢发育受抑制, 性激素水平下降, 雌鱼出现雄性的繁殖行为^[2-3]。此外, 经现代工艺处理后的造纸废水排放口下游也同样发现了这种变异的鱼^[4]。对造纸废水进行有关内分泌干扰效应

的研究成为一项紧迫的任务。目前研究得较多的是采取化学手段对其中的污染物进行分析。如 Jenkins 等^[5]在发现有雄性化雌性食蚊鱼的河流中检测到化合物雄烯二酮(4-androstene-3,17-dione, AED)和孕酮(progesterone)^[6]。然而, 利用植物作为原材料的造纸废水中含有大量的植物甾醇素(phytosterol)^[7]以及其它小分子化合物, 化学分析较难对废水中众多的污染物进行一定量。而生物测试方法由于其灵敏、简便、快速, 并能综合评价的环境样品的内分泌干扰效应, 已

《环境科学与技术》编辑部 (网址) <http://fjks.chinajournal.net.cn> (电话) 027-87643502 (电子信箱) hjksyjs@vip.126.com

收稿日期 2014-10-01, 修回 2014-11-04

基金项目 广东省教育厅科技计划“育苗工程”(2012LYM0100), 广州市市属高校科技计划(2012A040)

作者简介 侯丽萍(1977-), 女, 讲师, 博士研究生, 主要从事废水的内分泌干扰效应研究 (电话) 020-39366913 (电子信箱) houliping7710@163.com;

* 通讯作者, 男, 教授, 硕士生导师 (电话) 020-39366913 (电子信箱) 973796605@qq.com。

广泛的被应用于环境水样的内分泌干扰检测^[8-10]。

广东省四会市邓村地处广东省北部,该地采用古法造纸工艺进行制浆造纸。研究发现,受竹浆造纸废水所污染的邓村河道中出现了明显雄性化的雌性食蚊鱼^[11],同时检测到雄烯二酮、孕酮等化合物^[12],表明造纸废水的排放造成了当地环境类雄激素物质的污染。本研究采用重组人雄激素受体基因酵母及重组人雌激素受体基因酵母对广东四会市邓村河水体中的雌激素效应、雄激素效应和抗雌激素效应进行检测,以期对广东四会市邓村河水体中的内分泌干扰物排放水平进行估算,并对制浆造纸废水的环境激素污染效应进行安全评价,为造纸废水的环境治理提供依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集与前处理

于邓村河造纸废水排放点的下游和上游分别选取了 REF、A、B、C 4 个采样点, A、B、C 采样点分别位于邓村造纸作坊的下游,对照点(REF)为不受造纸废水污染的位点,绥江是邓村河与对照位点河流汇入的

河流。样品采集的时间为 2009 年 8 月(夏季)。采样地点如图 1 所示。以棕色玻璃瓶采集各 1 L 水样(3 次平行),然后取同一断面水平面 0.5 m 以下左、中、右 3 个点混合样。水样立即加入 50 mL 甲醇(色谱纯)和 400 μ L 4 mol/L H_2SO_4 ,置于 4 $^{\circ}C$ 冰盒中运回实验室,并于 48 h 内进行前处理。使用水质参数仪测定各采样点水质参数(见表 1),如 pH 值、温度、硬度和 DO 值^[11]。

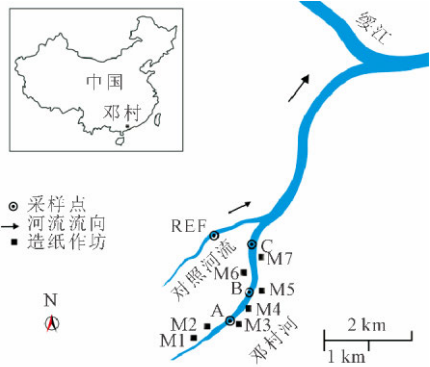


图1 四会邓村各采样点^[11]
Fig.1 Map showing the location of the sampling sites on Dengcun River

表 1 采样点水质的理化指标^[11]
Table 1 Water quality parameters of the Dengcun River and reference river

采样点	REF	A	B	C
位置(GPS)	N23°32'75' E112°58'05'	N23°31'10' E112°58'23'	N23°31'57' E112°58'60'	N23°32'46' E112°58'68'
水温/ $^{\circ}C$	24.5 \pm 0.1	24.3 \pm 0.2	24.1 \pm 0.3	24.2 \pm 0.2
电导性/ $\mu S \cdot cm^{-1}$	114.6 \pm 2.7	163.8 \pm 0.1	150.9 \pm 0.1	156.5 \pm 0.1
pH	7.9 \pm 0.2	7.6 \pm 0.1	7.8 \pm 0.1	7.5 \pm 0.1
溶解氧/ $mg \cdot L^{-1}$	1.8 \pm 0.1	1.1 \pm 0.3	1.4 \pm 0.2	1.3 \pm 0.1

注:数据用“平均数 \pm 标准差”的形式表示。

取 3 瓶(平行取样)1 L 水样,过 GF/F 滤膜。HLB 固相萃取柱分别加入 10 mL 甲醇和 10 mL Milli-Q 活化,10~15 mL/min 过 HLB 柱,加入 2 \times 50 mL 5%的甲醇水溶液润洗采样瓶,并将润洗溶液过 HLB 柱。擦干固相萃取装置内的水分,以锡纸轻轻覆盖 HLB 柱,抽干 2 h;以 4 mL 和 3 mL 甲醇(色谱纯)先后洗脱 HLB 柱,再以 3 mL 和 2 mL 二氯甲烷(色谱纯)先后洗脱 HLB 柱,合并洗脱液于 N_2 下轻轻吹干,以 1 mL 甲醇(色谱纯)重新定容,过 0.22 μ m 有机相滤膜,转移至 2 mL 的棕色小瓶中,于 -18 $^{\circ}C$ 保存。

1.2 酵母菌的冻存与复苏

本研究用于雌激素活性筛选(Yeast estrogen screening, YES)实验所用的 YES 酵母菌和雄激素活性筛选(Yeast androgen screening, YAS)的 YAS 酵母菌均由英国 Dr. J P Sumpter 提供(Brunel University, Uxbridge, UK),其中雌激素效应和抗雌激素效应采用 YES 酵母菌测试,雄激素效应采用 YAS 酵母菌测试。SC 培养基添加硫酸酮、色氨酸、腺嘌呤、赖氨酸。30 $^{\circ}C$ 、150 r/min 条件下将 1 mL 新鲜冻融的酵母菌液加

入到 30 mL 培养液中培养过夜。取过夜培养的菌液稀释 10 倍于 600 nm 处测定吸光度值,向培养基中加入无菌甘油,以 1 mL 分装于 EP 管中,逐步降温,最后保存在 -80 $^{\circ}C$ 冰箱中^[13]。

1.3 重组基因酵母测试

1.3.1 雌激素与抗雌激素活性物质筛选

YES 实验的操作步骤按照赵建亮^[13]的方法,两个平行的样品各自在 96 孔板上稀释,依次以甲醇进行 2 倍稀释,每个样品稀释 8 次,吸取 10 μ L 稀释后的样品到另外一个 96 孔板的相应的孔位置上,待溶剂挥发干。然后准备适量的生长培养基,接种在一天前培养的酵母溶液(620 nm 吸光度为 1 左右比较适合接种)。再加入 CPRG(氯酚红-D-半乳糖苷),使之浓度为 0.1 mg/mL。微孔板以胶带密封好,并以锡纸完全包好,于微孔板振荡器上 600 r/min 震荡 2 min,使样品与酵母细胞溶液完全混合,然后置于 32 $^{\circ}C$ 恒温培养 72 h,其中在 24 h 时再次震荡 2 min。最终以酶标仪(BMG Lab technologies, Offenburg, Germany)在 620 nm 和 540 nm 测定吸光度。E2(雌二醇)作为阳性控制,同时

也作为标准曲线,微孔板上 E2 的初始浓度为 $2.7 \mu\text{g/L}$ ($0.01 \mu\text{mol/L}$),纯甲醇样品作为空白。激素 E2 的 YES 实验、甲醇空白和只加 60%最大雌激素效应的 E2 同时进行。

抗雌激素活性的筛选 (Yeast anti-estrogen screening, YAES) 实验以他莫昔芬(TAM)作为阳性对照物质。首先在 96 孔板的每一个孔内加入浓度为 $1.36 \mu\text{g/L}$ 的 E2 $10 \mu\text{L}$ (60%的最大雌激素效应所对应的 E2 浓度),然后加入 $10 \mu\text{L}$ 从最大浓度为 742 mg/L 依次 2 倍稀释的 TAM 甲醇溶液,待溶剂挥发干后,按照 YES 实验方法进行。YAES 实验时,雌激素 E2 的 YES 实验、甲醇空白和只加 60%最大雌激素效应的 E2 同时进行。

1.3.2 雄激素活性物质筛选

以 DHT 为雄激素活性筛选(Yeast androgen screening, YAS)实验的标准对照物质,准备 DHT 起始浓度为 $581 \mu\text{g/L}$ 的标准溶液(甲醇溶液 $2 \mu\text{mol/L}$),在 96 孔板上依次稀释,方法同 YES 实验,所用菌种为重组雄激素受体基因的酵母菌,亦由英国 Dr. J P Sumpter 提供(Brunel University, Uxbridge, UK)。酵母菌的接种、培养和吸光度检测按照文献[13]方法进行,所有操作步骤与 YES 实验相同,所不同的只是培养条件,接种样品后于 32°C 恒温培养 24 h 之后,转移至 28°C 恒温培养 12 h,测定吸光度。甲醇空白实验同时进行。

1.4 数据分析

EEQ 根据文献 Beck^[14]报道方法计算。正常情况下实际样品应当与标准物质 E2 具有相同的剂量效应关系。E2 的标准曲线表达为平行样品绝对吸光度的算术平均值(减去纯甲醇的空白值)与剂量的对数(相应的 ng/L)。雄激素 DHT 的标准曲线采用 Sigmaplot 10.0 软件以 log-logistic 模型拟合。

1.5 质量控制

在雌激素和抗雌激素当量测定实验前,对对照点 REF 点水样加入 54.48 ng E2 (加入 $54.48 \mu\text{L}$ 1 mg/L 的 E2 储液)标准样品,提取时与样品同时进行,最后测得的 EEQ 和 TEQ 值在 $42\sim 60 \text{ ng}$ 之间。在雄激素当量测定实验前,对对照点 REF 点水样加入 500 ng DHT (加入 $50 \mu\text{L}$ 10 mg/L 的 DHT 储液)标准样品,提取时与样品同时进行,最后测得的 DEQ 值在 $400\sim 600 \text{ ng}$ 之间。

2 结果

2.1 雌激素当量浓度 EEQ

体外雌激素效应测定结果如图 2 所示,本研究设

4 个采样点,REF 采样点雌激素当量值 EEQ (E2 equivalents) 为 3.68 ng/L ,A 采样点 EEQ 值最高,为 20.03 ng/L ,B 点为 15.332 ng/L ,C 点为 13.27 ng/L ,均比对照采样点高。

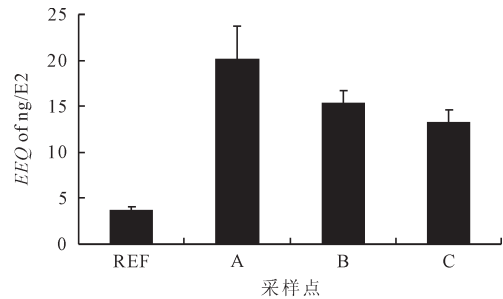


图2 邓村河各点雌激素当量
Fig.2 Estrogenic activity of surface water samples in Dengcun River

2.2 抗雌激素当量浓度

体外抗雌激素效应测定结果如下图 3 所示,本研究设 4 个采样点,REF 雌激素当量值 TEQ(E2 equivalents) 0.8 ng/L ,A 采样点值最高,为 138.54 ng/L ,B 点为 27.61 ng/L ,C 点为 31.77 ng/L ,造纸废水暴露位点的 TEQ 值均比对照位点的高。

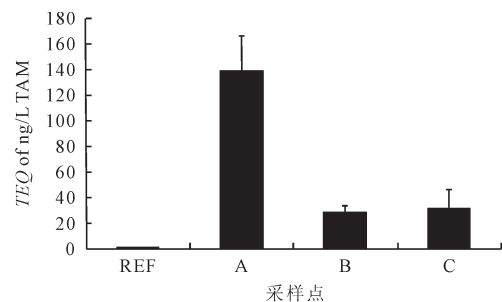


图3 邓村河各点抗雌激素当量
Fig.3 Anti-estrogenic activity of surface water samples in Dengcun River

2.3 雄激素当量浓度 DEQ

体外雄激素效应测定结果如图 4 所示,REF 和 4 个采样点的雄激素当量值 DEQ(E2 equivalents)分别如下,REF 采样点为 0.21 ng/L ,A 为 6.52 ng/L ,B 点为 3.92 ng/L ,C 点为 4.21 ng/L ,造纸废水暴露位点的 DEQ 值均比对照位点高。

3 讨论

3.1 体外雌激素活性

研究表明,受造纸废水污染位点的体外雌激素活性均比对照位点的高,对照点雌激素当量值 EEQ 为 3.68 ng/L ,造纸废水暴露位点中 A 点值最高,为 20.03 ng/L 。本结果显示,邓村竹浆造纸废水具有明显的体外雌激素效应。研究者推测造纸废水中的雄激素物质通过细菌的作用,代谢转化为雌激素物质,而产生了

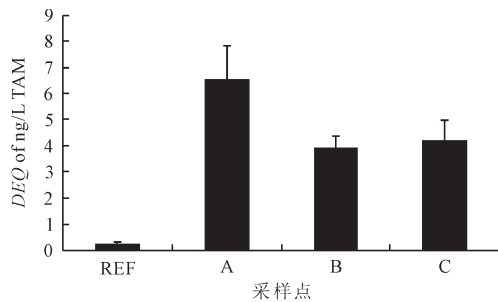


图4 邓村造纸废水河各点雄激素当量
Fig.4 Adrogenic activity of surface water samples in Dengcun River

雌激素效应^[15]。野外调查^[16]和室内暴露^[17-19]的研究也同时表明,造纸废水具有这种效应。但也有研究表明,造纸废水不能诱导虹鳟鱼的幼鱼产生 VTG,显示其不具备雌激素活性^[20]。关于造纸废水究竟是否具备雌激素效应的研究报道各不相同,结果与造纸的工艺流程、所处的实际环境密切相关,其中的机理仍需要进一步的研究阐明。

重组基因酵母筛选法是目前较为广泛应用的内分泌干扰物筛选法之一。然而,与受体结合仅是内分泌干扰作用的多个模式中的一种途径。很多活体生物试验虽然证实有类雌激素性质的化合物,酵母菌筛选实验却显示出阴性的结果。研究发现,除了经典的受体结合途径外,还可能存在着引起类雌激素活性的其它快速信号转导途径^[21-24]。另一方面,重组基因酵母法虽然灵敏、简单、快速,但是不可能完全代表生物体内完整的代谢变化。化合物由于有不同的膜传输方式,并且胞膜结构也不同,因此可能会影响到化合物进入酵母细胞与雌激素受体的结合^[25]。

3.2 体外抗雌激素活性

体外抗雌激素效应测定结果表明,对照点 REF 他莫昔芬当量值 TEQ 为 0.8 ng/L, A 点值最高,为 138.54 ng/L, B 点为 27.61 ng/L, C 点为 31.77 ng/L。赵建亮等^[13]对珠江各河段的水样及其沉积物进行抗雌激素当量测试时发现,石井河的大部分样品在地表水中中和沉积物中具有明显的抗雌激素效应,当量达到了浓度分别达到(805±69.4) μg/L TEQ 和(82.8±3.7) μg/g TEQ。而本研究中,与对照点相比,造纸废水各采样点的抗雌激素效应比较明显。Orrego 等^[18]在造纸废水中检测到脱氢松香酸(Dehydroabietic acid, DHAA)和 β-谷甾醇(β-sitosterol, BS) 2 种化合物,用 2 种化合物对鱼类进行暴露实验发现, DHAA 能抑制鱼 VTG 的生成,显示具有抗雌激素效应。有可能 DHAA 与雌激素共同竞争雌激素受体从而抑制的 VTG 的产生^[18]。造纸废水中的 DHAA 对鱼类产生抗雌激素效应可能通过直接损伤肝组织的途径^[26]。因此,有人推测造

纸废水中的 DHAA 可产生细胞毒素病直接损伤肝脏,从而表现出抗雌激素效应^[18]。此外, EROD 活性的升高与抗雌激素效应密切相关,造纸废水中有可能存在大量抗雌激素活性的小分子化合物,在诱导食蚊鱼体内 EROD 活性升高的同时,抑制 E2 的浓度,显示抗雌激素。

3.3 体外雄激素活性

研究表明,受造纸废水污染的各位点雄激素活性均比对照点高,其中 A 点 DEQ 值最高。有研究者运用体外酵母实验对多种造纸废水进行了检测,研究发现这些造纸废水同时具有强烈的雄激素和抗-雄激素效应,虽然效应的强弱程度不是很一致。产生的效应与造纸水的成分、酵母的种类、转导培养的时间等参数密切相关^[27-30]。Shamba Chatterjee 等^[31-32]用改进了的体外酵母实验发现,造纸废水具有体外的雄激素效应和抗雄激素效应。但也有研究表明造纸废水不存在这种效应^[33-34]。最直接证据是世界多处造纸废水排放口中发现了雄性化的食蚊鱼^[35-36],揭示造纸废水中可能存在着雄激素物质。造纸废水中可能存在着大量与睾酮(testosterone)结构相似的物质,在体外实验中与 AR 结合,引起了 AR 的表达^[30]。Jenkins 等^[37-38]检测到造纸废水中含有雄烯二酮和反式雄烯二酮(androstadienedione, ADD)这 2 类物质,怀疑是它们诱导了食蚊鱼雄性化。因此,利用 YAS 快速检测水样中雄激素当量的方法虽然快速简单,但是当水样综合毒性太大的时候最好的办法就是先将水样进行分馏,以不同的馏分测试雄激素效应和雌激素效应可以有效地避免太大的误差。此外,如前所述,已知具有内分泌干扰效应的化合物中,也表明存在其它影响内分泌干扰效应的因素,并不是通过和雌激素受体结合而产生效应,如通过干扰激素受体形成来降低激素受体复合物的浓度水。所以,造纸废水对鱼类内分泌系统造成的干扰效应可能还存在着其他的途径。

4 结论

采用重组基因酵母法对受造纸废水污染的广东四会市邓村河水体的雌激素、抗雌激素和雄激素活性效应进行检测,结果表明造纸废水污染的广东四会市邓村河水体均有雌激素、抗雌激素和雄激素活性效应,造纸废水的排放可能对当地环境造成了内分泌干扰物质的污染。因此,对造纸废水中的化合物进行定量定性分析,以及研究这些化合物的相互关系和代谢途径,是今后工作的重点所在。

【参考文献】

- [1] 杜兵,张彭义,张祖麟,等.北京市某典型污水处理厂中内分

- 泌干扰物的初步调查[J]. 环境科学, 2004, 25(1): 114–116.
- Du Bing, Zhang Pengyi, Zhang Zulin, et al. Preliminary investigation on endocrine disrupting chemicals in a sewage treatment plant of Beijing[J]. Environmental Science, 2004, 25(1): 114–116. (in Chinese)
- [2] Parks LG, Lambright CS, Orlando EF, et al. Masculinization of female mosquito fish in kraft mill effluent contaminated Fenholloway River water is associated with androgen receptor agonist activity[J]. Toxicological Sciences, 2001, 62(2): 257–67.
- [3] Orn S, Svenson A, Viktor T, et al. Male-biased sex ratios and vitellogenin induction in zebra fish exposed to effluent water from a Swedish pulp mill[J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2006, 51(3): 445–451.
- [4] Edward F, Orlando Danielle E Bass, Lisa M Caltabiano, et al. Altered development and reproduction in mosquito fish exposed to pulp and paper mill effluent in the Fenholloway River, Florida USA[J]. Aquatic Toxicology, 2007, 84(4): 399–405.
- [5] Jenkins R, Angus R A, McNatt H, et al. Identification of androstenedione in a river containing paper mill effluent[J]. Environ Toxicology Chemistry, 2001, 20: 1325–1331.
- [6] Jenkins R L, Wilson E M, Angus R M, et al. Androstenedione and progesterone in the sediment of a river receiving paper mill effluent[J]. Toxicological Sciences, 2003, 73: 53–59.
- [7] Conner A H, Rowe J W. Neutrals in southern pine tall oil[J]. Journal of the American Oil Chemis Society, 1975, 52: 334–338.
- [8] 饶凯锋, 马梅, 王子健, 等. 北方某水厂的类雌激素物质变化规律[J]. 中国给水排水, 2005, 21(4): 13–16.
- Rao Kaifeng, Ma Mei, Wang Zijian, et al. Variation of estrogen-like matters in a water treatment plant in north China[J]. China Water and Wastewater, 2005, 21(4): 13–16. (in Chinese)
- [9] 李剑, 崔青, 马梅, 等. 应用重组孕激素基因酵母测定饮用水中内分泌干扰物的方法[J]. 环境科学, 2006, 27(12): 2463–2466.
- [10] 崔青, 李剑, 马梅, 等. 利用重组基因酵母法和 S9 代谢活化检测饮用水雌激素物质[J]. 高技术通讯, 2007, 17(6): 643–647.
- Cui Qing, Li Jian, Ma Mei, et al. Screening for estrogens in drinking water using recombinant gene yeast bioassay after metabolic activation by rat liver S9 fraction[J]. High Technology Letters, 2007, 17(6): 643–647. (in Chinese)
- [11] Liping Hou, Yongping Xie, Guangguo Ying, et al. Developmental and reproductive characteristics of western mosquito fish (*Gambusia affinis*) exposed to paper mill effluent in the Dengcun River, Sihui, South China[J]. Aquatic Toxicology, 2011, 103 (3/4): 140–149.
- [12] 侯丽萍, 刘珊, 方展强, 等. 广东四会邓村河水体中雌/雄激素物质的含量及分布[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(1): 135–140.
- Hou Liping, Liu San, Fang Zhanqiang, et al. Concentrations and distribution of estrogenic and androgenic chemicals in water collected from Dengcun River, Sihui City, Guangdong Province[J]. Journal of Agro-environment Science, 2013, 32 (1): 135–140. (in Chinese)
- [13] 赵建亮, 应光国. 珠江典型河流中内分泌干扰物、药物和个人护理品的分布特征及其风险评价[R]. 广州: 中国科学院广州地球化学研究所, 2009: 24–26.
- Zhao Jianliang, Ying Guangguo. Occurrence and Screening-Level Risk Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals and Pharmaceuticals and Personal Care Products in Typical Pearl Rivers[R]. Guangzhou: Guangzhou Research Institute of Geochemistry, the Chinese Academy of Sciences, 2009: 24–26. (in Chinese)
- [14] Beck IC, Bruhn R, Gandrass J, et al. Analysis of estrogenic activity in coastal surface waters of the Baltic Sea using the yeast estrogen screen[J]. Chemosphere, 2006, 63: 1870–1878.
- [15] Orlando EF, Davis WP, Guillelte LJ. Aromatase activity in the ovary and brain of the eastern mosquito fish (*Gambusia holbrooki*) exposed to paper mill effluent[J]. Environmental Health Perspect, 2002, 110: 429–433.
- [16] Orrego R, Burgos A, Moraga-Cid G, et al. Effects of pulp and paper mill discharges on caged rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): biomarker responses along a pollution gradient in the Biobio River, Chile[J]. Environmental Toxicology Chemistry, 2006, 25: 2280–2287.
- [17] Orrego R, Guchardi J, Hernandez V, et al. Pulp and paper mill effluent treatments have differential endocrine-disrupting effects on rainbow trout[J]. Environmental Toxicology Chemistry, 2009, 28: 181–188.
- [18] Orrego R, McMaster M, Van der Kraak G, et al. Effects of pulp and paper mill effluent extractives of aromatase CYP19a gene expression and sex steroids levels in juvenile rainbow trout[J]. Aquatic Toxicology, 2010, 97(4): 353–360.
- [19] Orrego R, Moraga-Cid G, Gonzalez M, et al. Reproductive, physiological and biochemical responses in juvenile female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sediment from pulp and paper mill industrial discharge areas [J]. Environmental Toxicology Chemistry, 2005, 24: 1935–1943.
- [20] Sherry J, Gamble A, Fielden M, et al. An ELISA for brown trout (*Salmo trutta*) vitellogenin and its use in bioassays for environmental strogens[J]. Science of the Total Environment, 1999, 225: 13–31.
- [21] Eric R Prossnitz, Marcello Maggiolini. Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30 [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2009, 308: 32–38.
- [22] Ruixia Guo, Lihui Wei. 17-estradiol activates PI3K/Akt signaling pathway by estrogen receptor (ER)-dependent and ER-independent mechanisms in endometrial cancer cells[J]. Jour-

- nal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2006, 99: 9–18.
- [23] Patricia Varju, KenC Chang. Temporal profile of estrogen dependent gene expression in LHRH-producing GT1-7cells [J]. Neurochemistry International, 2009, 54: 119–134.
- [24] Diana C M'arquez, Hsiao-Wang Chen. Estrogen receptors in membrane lipid rafts and signal transduction in breast cancer [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2006, 246: 91–100.
- [25] 陈旭, 朱琳, 孙红文. 3 种环境雌激素检测和筛选方法的比较[J]. 安全与环境学报, 2004, 6(4): 33–36.
Chen Xu, Zhu Lin, Sun Hongwen. Comparison among three screening methods for environmental estrogens[J]. Journal of Safety and Environment, 2004, 6(4): 33–36. (in Chinese)
- [26] Christianson-Heiska IL, Isomaa B. The use of primary hepatocytes from brown trout (*Salmo trutta lacustris*) and the fish cell lines RTH-149 and ZF-L for *in vitro* screening of (anti) estrogenic activity of wood extractives[J]. Toxicology in Vitro, 2008, 22: 589–597.
- [27] Sohoni P, Sumpter JP. Several environmental oestrogens are also antiandrogens[J]. Journal of Endocrinology, 1998, 158: 327–339.
- [28] Lee LS, Carmosini N, Sasman SA, et al. Agricultural contributions of antimicrobials and hormones on soils and water quality[J]. Advance in Agronomy, 2007, 93: 2–67.
- [29] Michelini A, Leskinen P, Virta M, et al. Anewre combinant cell based bioluminescent assay for sensitive androgen-like compound detection[J]. Biosens Bioelectrons, 2005, 20: 2261–2267.
- [30] Christiaens V, Berckmans P, Haelens A, et al. Comparison of different androgen bioassays in the screening for environmental (anti) androgenic activity [J]. Environmental Toxicology Chemistry, 2005, 24(10): 2646–2656.
- [31] Shamba Chatterjee a, Chandrajeet B Majumderb, Partha Roy. Development of a yeast—based assay to determine the (anti) androgenic contaminants from pulp and paper mill effluents in India[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2007, 24: 114–121.
- [32] Svenson A, Allard A S. In vitro androgenicity in pulp and paper mill effluents[J]. Environmental Toxicology, 2004, 19: 510–517.
- [33] Van Der Kraak GJ, Munkittrick KR, McMaster ME, et al. Exposure to bleached kraft pulp mill effluent disrupts the pituitary-gonadal axis of white sucker at multiple sites[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 1992, 115: 224–233.
- [34] Van den Heuvel MR, Ellis RJ, Tremblay LA, et al. Exposure of reproductively maturing rainbow trout to a New Zealand pulp and paper mill effluent[J]. Ecotoxicology Environmental Safety, 2002, 51: 65–75.
- [35] Parks LG, Lambright CS, Orlando EF, et al. Masculinization of female mosquito fish in kraft mill effluent contaminated Fenholloway river water is associated with androgen receptor agonist activity[J]. Toxicological Sciences, 2006, 92: 257–267.
- [36] Bandelj E, van den Heuvel MR, Leusch FDL, et al. Determination of the androgenic potency of whole effluents using mosquito fish and trout bioassays[J]. Aquatic Toxicology, 2006, 80: 237–248.
- [37] Jenkins R, Angus RA, McNatt H, et al. Identification of androstenedione in a river containing paper mill effluent[J]. Environmental Toxicology Chemistry, 2001, 20: 1325–1331.
- [38] Jenkins RL, Wilson EM, Angus RA, et al. Production of androgens by microbial transformation of progesterone in vitro: a model for androgen production in rivers receiving paper mill effluent[J]. Environmental Health Perspect, 2004, 112: 1508–1511.

(上接第 147 页)

- 2010, 21(1): 17–19. (in Chinese)
- [8] 孔庆安, 吴奇藩, 王超. 印染废水混凝脱色机理[J]. 中国给水排水, 1995, 11(3): 31–33.
Kong Qing'an, Wu Qipan, Wang Chao. The mechanism of decolorization of printing and dyeing wastewater by coagulation[J]. China Water & Wastewater, 1995, 11(3): 31–33. (in Chinese)
- [9] 陈文松, 韦朝海. Fenton 氧化-混凝法处理印染废水的研究[J]. 工业水处理, 2004, 24(4): 39–41.
Chen Wensong, Wei Chaohai. Study on Fenton oxidation-coagulation process for the treatment of printing and dyeing wastewater[J]. Industrial Water Treatment, 2004, 24(4): 39–41. (in Chinese)
- [10] 张良林, 徐晓军, 郭建民, 等. 均相 Fenton 氧化-混凝法强化处理印染废水[J]. 化工环保, 2006, 26(1): 38–40.
Zhang Yinlin, Xu Xiaojun, Guo Jianmin, et al. Enhanced treatment of dyeing wastewater by homogeneous phase Fenton oxidation-coagulation process[J]. Environmental Protection of Chemical Industry, 2006, 26(1): 38–40. (in Chinese)
- [11] 王亚林, 徐乾前, 章琴琴. H_2O_2 对 COD 测定的干扰及消除研究[J]. 环境污染与防治, 2013, 34(12): 52–56.
Wang Yalin, Xu Qianqian, Zhang Qinqin. Study on the interference of H_2O_2 on COD determination and the correction method[J]. Environmental Pollution & Control, 2013, 34(12): 52–56. (in Chinese)
- [12] 亚乾. Cl^- , NH_3 和 H_2O_2 对 COD 测定的影响[J]. 上海环境科学, 1995, 14(8): 32–34.
Ya Qian. Effects of chloride, ammonia and hydrogen peroxide on COD measurement[J]. Shanghai Environmental Science, 1995, 14(8): 32–34. (in Chinese)